

特開平4-279597

(43) 公開日 平成4年(1992)10月5日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K	7/06	Z N A Z	8318-4H	
A 2 3 L	1/202		7804-4B	
	1/237		7823-4B	
	1/238	Z	7823-4B	
	1/305		8114-4B	

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-42022

(22) 出願日 平成3年(1991)3月7日

(71) 出願人 591045471

岐阜菱峰株式会社

岐阜県岐阜市加納桜田町1丁目1番地

(72) 発明者 鷺野 遼之

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 岐阜菱峰株式会社内

(72) 発明者 三島 敏

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 岐阜菱峰株式会社内

(74) 代理人 弁理士 恩田 博宣

(54) 【発明の名称】 新規なペプチド及びアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド並びにそれらを含有する経口摂取組成物

(57) 【要約】

【目的】 血圧上昇作用を有するアンジオテンシン変換酵素を阻害できる新規なペプチドを提供すること及びこれを健康食品や医薬品として利用できる経口摂取組成物を提供することにある。

【構成】 Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp なる構造を有するペプチド、Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys なる構造を有するペプチド及びTyr-Asn-Glu-Val-Pro なる構造を有するペプチドである。また、ローヤルゼリーを蛋白質分解酵素により分解してなるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドである。さらに、上記ペプチドを含有する経口摂取組成物である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp なる構造を有するペプチド。

【請求項2】 Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys なる構造を有するペプチド。

【請求項3】 Tyr-Asn-Glu-Val-Pro なる構造を有するペプチド。

【請求項4】 ローヤルゼリーを蛋白質分解酵素により分解してなるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド。

【請求項5】 経口摂取可能な請求項1~4のペプチドを含有する経口摂取組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、高血圧の予防等を目的とする医薬品、健康食品等として有用な新規なペプチド及びアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド並びにそれらを含有する経口摂取組成物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】今日の老齢化社会において、心臓病、脳血管障害、ガンなどの成人病は生命に重大な脅威を与えている。それらの増悪因子として大きなウェートを占めているものに高血圧症があり、高血圧症の治療および予防が大きな課題となっている。高血圧症には2次性高血圧症と本態性高血圧症があり、その中で主を占める本態性高血圧症は、食塩の摂取過剰、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、カリクレイン-キニン-プロスタグランジン系の調節不全、カテコラミン分泌過剰などの相互作用により、発症するものと考えられている。

【0003】このレニン-アンジオテンシン系、カリクレイン-キニン系の調節にはアンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme、以下ACEという)が存在し、血液中に昇圧ペプチドであるアンジオテンシン2を産生する一方で、降圧ペプチドであるキニンを加水分解する作用を有する酵素である。従ってACEを阻害することは全体として血圧上昇を抑制することになる。

【0004】この様な考えから、天然物および合成物についてACE阻害物質の探索が精力的に行われ、すでにプロリン誘導体化合物がその有用性から実用に供されている。一方、ある種の食品、漢方薬の中にも、作用の強弱はあるものの本酵素阻害作用があることも報告されている (日本農薬学会誌、Vol.57, No.11, 1143, 1983)。それらの中で、カゼインのトリプシン分解物についてだけ、ACE阻害ペプチドの単離、精製がなされ、アミノ酸構造も解明されているのが現状である (特開昭58-109425号)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】高血圧症の中でも、特に、本態性高血圧症は発症原因が多岐にわたるため、根本的な治療法もなく、対症療法がほとんどである。その

ため日常的な血圧のコントロールは、いわゆる降圧剤もしくは血圧降下作用を有する成分の含有された健康食品を摂取することにより行われている。血圧を正常にコントロールすることは成人病の増悪因子を減少させ、ひいては生体の老化現象を遅延させるために、人類が切望しているものでもある。

【0006】古来、世界各国で食用されてきたローヤルゼリーは高血圧、糖尿病、ガン、更年期障害、神経痛、脳血管障害等に有用であると報告されている。また、若年者の正常な心身の発達をもたらす、ローヤルゼリーを食してきたものには長寿の者が多いと言われている。しかし、ローヤルゼリーの中の生理活性物質が何であるかについて解明した報告は少なく、ローヤルゼリーの中の最大の生理活性物質と言われている10-ヒドロキシデセン酸の作用をみたものがほとんどである。

【0007】そこで本発明の目的は、血圧を上昇させる作用を有するアンジオテンシン変換酵素を阻害し、降圧作用を発揮できるペプチドを提供すること及びこのペプチドを健康食品や医薬品として利用できる経口摂取組成物を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】即ち、第1の発明は、Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp なる構造を有するペプチド (以下、RJP₁と略す)をその要旨としている。第2の発明は、Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys なる構造を有するペプチド (以下、RJP₂と略す)をその要旨としている。

【0009】第3の発明は、Tyr-Asn-Glu-Val-Pro なる構造を有するペプチド (以下、RJP₃と略す)をその要旨としている。第4の発明は、ローヤルゼリーを蛋白質分解酵素により分解してなるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドをその要旨としている。第5の発明は、経口摂取可能な第1~4の発明のペプチドを含有する経口摂取組成物をその要旨としている。

【0010】次に、各発明について詳細に説明する。第1~3の発明でいうペプチドRJP₁、RJP₂及びRJP₃は、それぞれSer-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp、Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys及びTyr-Asn-Glu-Val-Pro なる構造を有し、後述する製造方法によって製造され、構造解析によって構造が決定されている。これらのペプチドは、前述したACEを阻害するペプチドである。上記ペプチドを構成するアミノ酸は、次の意味を表す。即ち、Serはセリン、Leuはロイシン、Proはプロリン、Lysはリジン、Hisはヒスチジン、Gluはグルタミン酸、Trpはトリプトファン、Ileはイソロイシン、Tyrはチロシン、Asnはアスパラギン、Valはバリンである。

【0011】次に、第4の発明でいうローヤルゼリー由来のACE阻害ペプチドとしては、例えば以下に示す如きアミノ酸配列を有するRJP_n (nはアミノ酸数を表

3

す。例えば、 $n=4\sim 20$ のポリペプチド)などがあり、それらは単独で、もしくは、混合物として用いられる。これらACE阻害ペプチドはトリプシン、キモトリプシン、ペプシン、プロメライン、パパイン、プロリンエンドペプチダーゼ等の蛋白質分解酵素のほか、細菌由来の蛋白質分解酵素(例えばプロテアーゼ(ズブチリシン、サーモライシン、ナガーゼ等))の処理によって得られる。例えばRJP₁の調製は次のようにして行われる。蜂蜜由来のローヤルゼリーをpH5.0~9.0の条件下トリプシンにより分解し、分解物を酸処理あるいは加熱処理することにより蛋白質分解酵素および未分解ローヤルゼリー蛋白を沈殿除去する。

【0012】次いで、上清を必要ならばアルカリで中和し、減圧下濃縮し、ゲル濾過用の担体(東洋曹達株式会社製の商品名トヨパール40S)等を充填したカラムに添加し、蒸留水で溶出させ、ACE阻害画分を集める。そして、必要ならば同様の精製を繰り返すか又はイオン交換、疎水カラムクロマトグラフィ等で精製を繰り返すことにより、ACEを阻害する特徴を有するペプチドが得られる。

【0013】また、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィ(溶出液:0.05% トリフルオロ酢酸(TFA)を含むアセトニトリル/水のグラジエント溶出)によりACE阻害画分を分取することができる。また、有機化学的な合成法により得ることができる。以下にポリスチレン樹脂を用いる固相法を利用し、ペプチドRJP₁の合成を行う。用いるアミノ酸はすべてL体を用い、官能基は以下のように封鎖しておく。即ち、Ser(Tos)、Lys(2-chlorophenyl oxy carbonyl)、His(Tos)、Glu(O-Bzl)、Trp(Tos)である。()内が保護基を示す。なお、アミノ酸保護基の略号は以下の置換基を表す。

【0014】

Boc:tert-butyloxy-carbonyl基

Tos:p-トルエンスルフォニル基

Bzl:ベンジル基

PAM:p-methoxy phenyl acetamidomethyl resin

AA_n:n番目のアミノ酸

ポリスチレン樹脂に架橋されたAA₁(AA₁-PAM)をTFAを用いた脱保護基反応によりH-AA₁-PAMを合成し、それにBoc-AA₂-OHをジクロロメタン中でDCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)を用いてジメチルホルムアミド中で縮合させ、Boc-AA₂-AA₁-PAMを合成、未反応のAA₁-PAMを無水酢酸を用い不活性化する。

【0015】得られたBoc-AA₂-AA₁-PAMを再度TFAで脱保護基反応を行い、同様にBoc-AA₃-OHを縮合させ、以下同様にして、AA₃まで縮合反応を行う。なおAA₁=Ser, AA₂=Leu, AA₃=Pro, AA₄=Lys, AA₅=Leu, A

4

AA₆=His, AA₇=Glu, AA₈=Trpである。縮合反応終了後、フッ化水素(HF)を用い脱保護基反応を行い、Boc、PAMおよび側鎖の保護基を除去し、目的とするペプチドRJP₁を得る。

【0016】以上の様に得られたローヤルゼリー由来ACE阻害ペプチド類は通常、粉末の形状で単離し、適当な無毒性の経口投与用担体と共に適宜な形状、形態からなる組成物として医薬品又は経口摂取用もしくは経腸栄養剤などに供してもよい。組成物の例としてはACE阻害ペプチドと薬学的に許容される担体(賦形剤、滑沢剤、結合剤、着色剤、矯味剤、賦香剤)と共に経口投与用の医薬品製剤の形態、例えば錠剤(糖衣錠、発泡剤、フィルムコート錠、咀嚼錠など)、カプセル剤、トローチ剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤などとしたものがある。

【0017】また、固形、液状の医薬品又は食品もしくは嗜好品、例えば、菓子類、粉末茶、スポーツ飲料、アルコール飲料、アイスクリーム、ヨーグルトなどの形態としてもよい。前記経口摂取食物中のACE阻害ペプチドの含有量は剤形により適宜選択が可能であるが一般に0.01~100重量%の範囲である。

【0018】以下の如く本発明の経口摂取食物は後で示す試験例の様に強力なACE阻害作用を示し、これを高血圧症の予防、高血圧傾向の緩和または血圧調節を目的として、継続的に摂取することが可能であり、高血圧予防のための健康食品等としての使用により、その有効性が発揮できる。この目的に本発明の経口摂取食物を用いる場合、一般的に1日あたり0.01~50mg/kg体重の範囲で経口摂取するのが適当である。

【0019】さらに、前記活性ペプチドと蜂産品、即ち、ローヤルゼリー、プロポリス、蜂蜜、花粉、蜂の子等と適宜に併用もしくは混和することにより、より一層効果を向上させることができる。即ち、上記の蜂産品でも、加工したもの(例えば加熱処理したもの、又は凍結乾燥粉末などの各種形状のもの)であっても良い。また、経口摂取組成物としては、活性成分を薬学的に許容される担体と共に経口投与用の医薬品製剤の形態(例えば、錠剤など)にしたり、食品、嗜好品の形態にして用いることができる。

【0020】

【作用】第1~3の発明のペプチドRJP₁、RJP₂及びRJP₃は、いずれもACEを阻害する作用を発揮する。第4の発明では、ローヤルゼリーを原料とし、これを蛋白質分解酵素によって分解することにより得られるペプチドがアンジオテンシン変換酵素の阻害作用を発現する。

【0021】第5の発明では、第1~4の発明のペプチドを含有する組成物は、健康食品としての経口摂取組成物となり、ACEを阻害することにより、高血圧の予防等の作用が発現される。

【0022】

【実施例】以下に本発明を具体化した実施例について説明する。即ち、ACE阻害ペプチドの製造例、構造解析、ACE阻害ペプチドの活性測定法、本発明経口摂取物の活性成分であるローヤルゼリー由来ACE阻害ペプチドの急性毒性試験の結果について説明する。

【ACE阻害ペプチドの活性測定】1gの家兎の肺をアセトン中で沈降、乾燥した粉末（シグマ社製）を5mlのリン酸緩衝液（pH8.3）に溶解し、10000G、30分の遠心分離処理後の上清液を上記緩衝液で3倍に希釈してACE酵素液として、酵素阻害を測定した。測定法はBiochem. Pharm., Vol. 20, pp1637~1648, 1971および、Anal. Biochem., Vol. 84, pp361~369, 1978の方法に準じた。即ち、100mMリン酸カリウム緩衝液（300mM塩化ナトリウムを含む）pH8.3に、基質として1mMトリペプチド（His-His-Leu、ペプチド研究所製）を100*

* μ l、ACE酵素液100 μ l及び試料液100 μ lを加え、37℃、30分間の反応後、沸騰水中で5分間加熱することにより、反応を終了させ、反応生成物の馬尿酸をトリクロロトリアジン試薬で誘導体化し、測定波長382nmにおける吸光度を比色定量する方法である。

【0023】阻害率は次式より算出した。

$$\text{阻害率} = (E_0 - E_s) / E_0 \times 100\%$$

E_0 ：阻害剤を含まない時の382nmの吸光度

E_s ：阻害剤を含む時の382nmの吸光度

10 なお、阻害率50%の時の試料濃度を IC_{50} とする。

【ACE阻害試験】ACE阻害作用（ IC_{50} ）の結果は表1の通りである。

【0024】

【表1】

試料	IC_{50}
製造例1のペプチド	108 μ g/ml
RJP ₅	2.5 μ g/ml
RJP ₈	2.8 μ g/ml
RJP ₉	5.7 μ g/ml
CEI ₁₂	110 μ g/ml
CEI ₁₇	10 μ g/ml
CEI ₈	10 μ g/ml

【0025】表1において、CEI₁₂、CEI₁₇、CEI₈はカゼイン由来ペプチドを示す。（フードケミカル、Nov. 39, 1988から引用した。）

【蛋白質濃度の測定】試料中のタンパク質の濃度をビュレット法で測定した。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いて換算した。

【製造例1、ACE阻害ペプチドの製造例】ローヤルゼリー蛋白2gをリン酸緩衝液（pH7）50mlに添加、さらにトリプシンを5mg加え、37℃で24時間インキュベートする。その後、沸騰水中で10分加熱処理する。放冷後、不溶物を遠心分離操作により除去し、得られた上清を陰イオン交換樹脂（東洋曹達株式会社製の商品名DEAEトヨパール）を充填したカラム（ ϕ 30mm \times 30cm）に添加した。

【0026】未吸着画分を陽イオン交換樹脂（東洋曹達株式会社製の商品名SPトヨパール）を充填したカラム（ ϕ 20mm \times 30cm）に添加し、吸着画分についてギ酸アンモニウムのグラジエント溶出を行った。溶出条件は0~0.5Mギ酸アンモニウム水溶液、pH6.8、流速1.0ml/min。さらに、アミコン濃縮器を用い、分子量5000未満のACE阻害画分を集め、凍結乾燥後、ACE阻害ペプチド283mg（白色粉

40 末）を得た。これはRJP₅、RJP₈及びRJP₉を含む粗組成物である。

【製造例2、ACE阻害ペプチドの製造例】ローヤルゼリー蛋白2gを50mlのリン酸緩衝液（pH2）に添加、さらにペプシン10mgを加え、37℃で24時間インキュベートする。その後、沸騰水中で10分間加熱処理する。放冷後、不溶物を遠心分離操作により除去し、得られた上清をトヨパール40Sが充填されたカラム（ ϕ 30mm \times 100cm）に添加し、蒸留水で溶出した。

【0027】活性画分をSPトヨパールを充填したカラム（ ϕ 20mm \times 30cm）に添加し、吸着画分についてギ酸アンモニウムのグラジエント溶出を行った。溶出条件は0~0.5Mギ酸アンモニウム水溶液、pH6.8、流速1.0ml/minである。さらに、アミコン濃縮器を用い、分子量500以上、5000未満のACE阻害画分を集め、凍結乾燥後、ACE阻害ペプチド258mg（白色粉末）を得た。これはRJP₅、RJP₈及びRJP₉を含む粗組成物である。

【製造例3、RJP₈の製造例】ローヤルゼリー蛋白2gをリン酸緩衝液（pH7）50mlに添加、さらにトリプシンを5mgを加え、37℃で24時間インキュベ

ートした。その後、塩酸でpH1にし、不溶物を遠心分離操作により除去し、得られた上清を減圧濃縮した。これを5mlに濃縮しセファデックスG-25カラムクロマトグラフィー(φ30mm×100cm)において蒸留水で溶出し、活性画分を分取し、濃縮した。

【0028】さらに、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：島津製作所製LC-8A型；カラムShimpack PREP-ODS(L)(φ50mm×25cm)を用い、溶出液は0.05%TFAを含むアセトニトリルのグラジエント溶出で活性画分を分取した。流速は10ml/min、検出器はSPD-M6A、検出波長210nmである。なお、分取したACE阻害精製ペプチドのうちRJP₆の凍結乾燥後の収量は15.3mg(白色粉末)であった。

【製造例4、RJP₆及びRJP₆の製造例】製造例1で得られたACE阻害ペプチドを逆相カラムを用いたHPLCでさらに分離精製を行い数種のACE阻害ペプチドから製造例3と同様にRJP₆及びRJP₆を得た。

【アミノ酸一次構造及びアミノ酸分析の例】次に、アミノ酸一次構造解析及びアミノ酸分析を行った。

【0029】製造例3及び製造例4のペプチドは島津製作所製全自動タンパク質一次構造分析装置PSQ-1システムにより、以下のポリペプチドであることが示された。また、アミノ酸分析システム(WATERS社製の商品名、PICO-TAGシステム)により、RJP₆、RJP₆及びRJP₆のアミノ酸組成を支持する分析結果が得られた。

【0030】

(RJP₆の一次構造)

Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp

(RJP₆の一次構造)

Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys

(RJP₆の一次構造)

Tyr-Asn-Glu-Val-Pro

(RJP₆のアミノ酸組成)

Glu 14.30%

Ser 14.28%

His 14.32%

Pro 14.25%

Leu 28.72%

Lys 14.16%

Trp — (測定不可)

(RJP₆のアミノ酸組成)

Glu 12.56%

Ser 12.37%

His 12.41%

Pro 12.43%

Leu 25.76%

Lys 12.67%

Ile 12.36%

Trp — (測定不可)

(RJP₆のアミノ酸組成)

Glu 20.60%

Val 21.32%

Pro 19.56%

Asn 19.82%

Tyr 19.96%

(各ACE阻害ペプチドの急性毒性試験)

(1) 試験方法

10 各ACE阻害ペプチドの5%水溶液を試料にして、ICR系マウス体重平均21.9±0.4gのものを1群10匹用いて実験に供した。試験前1晩絶食させ、例えば、当該ペプチド5g/Kgをゾンデを用いて経口投与した。投与後、1週間、生死および一般症状などの観察を行った。

(2) 試験結果

例えばRJP₆のLD₅₀は5g/Kg以上であり、死亡例はなかった。また、一般症状観察では虚脱、立毛、呼吸異常、るいそう(震え)、腹這い、発汗などの異常状態は全く見られなかった。なお、他のACE阻害ペプチドの結果も同様であった。

20 【0031】次に、製造例1、RJP₆、RJP₆及びRJP₆のACE阻害ペプチドの降圧作用について試験した。

(実験例1、各ACE阻害ペプチドの降圧試験)

(1) 試料及び投与方法

製造例1、製造例3及び製造例4で得られたペプチド1g/Kg体重となるように生理食塩水に溶解したもの5mlをゾンデで強制的に経口投与した。

30 (2) 実験動物

雄性自然発症高血圧ラット(SHR)8週令を1週間予備飼育した後、1群5匹使用した。

(3) 血圧測定

投与前後、非観血的尾動脈血圧計(理研)を用いて、経時的に各ラットの血圧を測定した。そして、その平均値を求めた。

(4) 試験結果

40 結果を表2に示した。表2より明らかなように、投与量に依存した血圧降下作用がみられた。また、その降下は投与6時間後でも持続していた。

(実験例2、配合例7の健康食品の降圧試験)後述する配合例7の健康食品(プロポリス液にRJP₆を混ぜたもの)3g/kg体重をゾンデで強制的に投与した。対照にはACE阻害ペプチドを含まないものを用いた。

【0032】以下、実験例1と同様に行った。その結果を表2に示す。次に、製造例1のペプチド又はRJP₆を配合して、下記配合例1~7に示す経口摂取組成物を作製した。

50 【配合例1】脱脂粉乳8.0重量%、植物油脂11.0重量%、砂糖14.0重量%、安定剤0.3重量%、乳化剤0.3

重量%、香料 0.1重量%、製造例1のペプチド 1.0重量%、卵黄 7.0重量%、水 55.0 重量%を混合、攪拌してアイスクリームを得た。

〔配合例2〕精製ハチミツ 12000mg、ビタミンC 1000mg、L-グルタミン酸ナトリウム 10mg、ニコチン酸アミド 10mg、製造例1のペプチド 5mg、香料 適量、これらに水を加えて全量を50mlとし、これを混合、攪拌してドリンク剤を得た。

〔配合例3〕食塩に製造例1のペプチドを5重量%混合して食卓塩を得た。

〔配合例4〕通常の製造方法で造られた味噌に、製造例1のペプチドを 0.5重量%練り込むことにより味噌を作*

*製した。

〔配合例5〕通常の製造方法で造られた醤油 100mlあたり、製造例1のペプチドを 0.5重量%混合することにより醤油を作製した。

〔配合例6〕通常の製造方法で造られたパン生地に製造例1のペプチドを 0.1重量%添加することによりパンを作製した。

〔配合例7〕通常の製造方法で造られた健康食品、例えばプロポリス食品 100g あたり、1重量%のRJP_αを添加することにより健康食品を作製した。

【0033】

【表2】

ペプチドの 投与量	血圧降下 mmHg		
	1Hr 後	3Hr 後	6Hr 後
製造例1のペプチド 1000mg/kg	9.5	16.5	19.5
RJP _α 500mg/kg	7.5	19.8	21.0
RJP _β 250mg/kg	3.8	15.7	17.0
500mg/kg	8.9	20.8	22.0
1000mg/kg	15.0	24.0	23.8
RJP _γ 1000mg/kg	12.0	19.0	21.8
実験例2の健康食品 3000mg/kg	—	12.5	13.8
対照	—	5.0	8.0
カゼイン由来ペプチド A 2800mg/kg (注1)	—	32.0	22.0 (注2)

【0034】表2において、血圧降下の値は、投与前血圧値-投与後血圧値の値を示す。なお、各例における投与前の血圧値は150~160mmHgである。

〔注1〕特開昭62-270533号公報の試験例1に基づく。この場合の血圧の初期値は174mmHgである。

〔注2〕投与5時間後の値である。

【0035】上記のように、ローヤルゼリーを蛋白質分解酵素で分解して得たペプチドを含む組成物を経口投与することにより、有効な血圧降下物質が得られたことはローヤルゼリーが古来から言われてきた生理作用を証明するものである。図1は、製造例1で得られたペプチドのフラクシオン数と波長280nmにおける吸光度との関係及びACE阻害活性を示すグラフである。図中、実線1は製造例1で得られたペプチドRJP_α、RJP_β及びRJP_γを含む組成物についてのフラクシオン数と吸光度との関係を示す線である。また、破線2はこの組成物についてのACE阻害活性を示す線である。同図からわかるように、実線1の吸光度が高くなるほど、それ

に対応して破線2も高くなっており、相関関係が認められる。そして、各ピークの位置にRJP_α、RJP_β又はRJP_γが存在しており、これを単離することによって、RJP_α、RJP_β及びRJP_γが得られる。

【0036】

【発明の効果】第1~3の発明でいうペプチドであるRJP_α、RJP_β及びRJP_γは、いずれも新規なペプチドであり、安全性が高く、高血圧の予防、治療等に有効性の高い医薬品または食品等の経口摂取組成物として有用なものであるという優れた効果を奏する。

【0037】第4の発明では、ローヤルゼリーを蛋白質分解酵素によって分解してなるペプチドは、特に高血圧の予防、治療等に有効であるという効果を奏する。第5の発明では、第1~4の発明のペプチドが、経口摂取可能なものであり、これを主成分とする組成物は、高血圧の予防等のための健康食品として好適な経口摂取組成物となるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例を表し、ペプチドのフラクシ

ン数と吸光度との関係及びアンジオテンシン変換酵素阻害活性を示すグラフである。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Leu Pro Lys Leu His Glu Trp

1 5

配列番号：2

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Leu Pro Ile Leu His Glu Trp Lys

1 5

配列番号：3

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

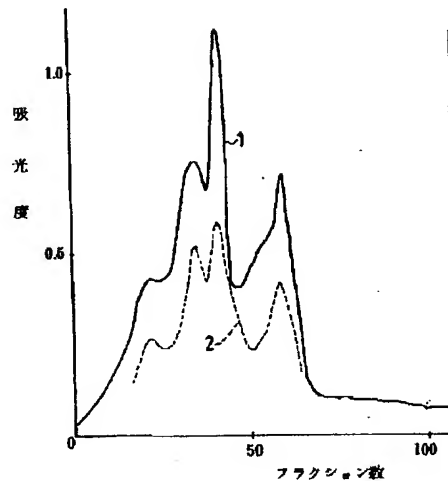
10 配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Asn Glu Val Pro

1 5

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

A23L 2/38

A61K 37/18

37/64

// C12N 9/99

C12P 21/06

C07K 99:00

識別記号 庁内整理番号

Z 9162-4B

8314-4C

ABU 8314-4C

8214-4B

F1

技術表示箇所

PTO 04-2310

Japanese Kokai Patent Application
No. Hei 4[1992]-279597

OVEL PEPTIDES AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITING PEPTIDES
AND ORAL COMPOSITION CONTAINING THE PEPTIDES

Noriyuki Washino and Satoshi Mishima

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. MARCH 2004
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT JOURNAL (A)
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 4[1992]-279597

Int. Cl⁵: C 07 K 7/06
A 23 L 1/202
1/237
1/238
1/305
A 23 L 2/38
A 61 K 37/18
37/64
//C 12 N 9/99
C 12 P 21/06
C 07 K 99:00

Sequence Nos. for Office Use: 8318-4H
7804-4B
7823-4B
8114-4B
9162-4B
8314-4C

Filing No.: Hei 3[1991]-42022

Filing Date: March 7, 1991

Publication Date: October 5, 1992

No. of Claims: 5 (Total of 7 pages)

Examination Request: Not filed

NOVEL PEPTIDES AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITING
PEPTIDES AND ORAL COMPOSITION CONTAINING THE PEPTIDES

[Shinkinapepuchidooyobi anjiotenshinhenkankosogai pepuchidonarabini soreraon ganyusuru
keikosetchoku soseibutsu]

Inventors: Noriyuki Washino and
Satoshi Mishima

Applicant: 591045471
Kifu Yoho Co., Ltd.

[There are no amendments in this patent]

Claim

12*

1. A peptide having a structure of Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp.
2. A peptide having a structure of Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys.
3. A peptide having a structure of Tyr-Asn-Glu-Val-Pro.
4. Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme, which are obtained by decomposing royal jelly using a protein decomposing enzyme.
5. Oral compositions containing peptides described in Claims 1-4.

[0001]

Industrial application field

The present invention relates to novel peptides, angiotensin-converting enzyme inhibiting peptides, which are useful for medical and pharmaceutical products for prevention of hypertension and the like, and oral compositions containing said peptides.

[0002]

Prior art

In today's aging society, adult diseases such as heart disease, cerebrovascular disorder, cancer, and the like are life-threatening. Hypertension plays an important role as the exacerbating factor of the adult diseases, and the treatment and prevention of hypertension have been become a major challenge. Hypertension is divided into secondary hypertension and primary hypertension. It is considered that the primary hypertension, which makes up most cases of hypertension, is caused by combined actions of excess intake of salt, imperfect control of rennin-angiotensin-aldosterone series and kallikrein-kinin-prostaglandins series, excess secretion of catecholamine, and the like.

[0003]

There is angiotensin-converting enzyme (hereinafter refer to as ACE) for controlling the rennin-angiotensin-aldosterone series and kallikrein-kinin-prostaglandins series, and it is an enzyme having a function of producing angiotensin 2 as a blood-pressure-raising peptide in the blood and hydrolyzing kallikrein as a blood-pressure-lowering peptide. Therefore, to suppress ACE inhibits raising the blood pressure in general.

* [Numbers in the right margin indicate pagination of the original language text.]

[0004]

From such a point of view, a search for ACE inhibiting substances in natural substances and synthetic substances has been energetically conducted, and proline derivatives are already used according to their usefulness. On the other hand, it was reported that certain food and Chinese medicines have the enzyme inhibiting function although the inhibiting strength is varied (J. of Japanese Agricultural Technology Society, Vol. 57, No. 11, 1143, 1983). Among those, only on trypsin hydrolyzate of casein, ACE inhibiting peptide is separated and purified, and the amino acid structure is also elucidated (Japanese Kokai Patent Application No. Sho 58[1983]-109425).

[0005]

Problem to be solved by the invention

There is no fundamental therapy and almost no symptomatic therapy especially in the primary hypertension since its cause is divergent. Therefore, daily blood pressure control is carried out by taking an antihypertensive agent or health food having antihypertensive activity. To control the blood pressure under normal conditions reduces the exacerbating factor of adult diseases and delays aging of an organism, and thus desirable for mankind.

[0006]

It has been reported since ancient times that royal jelly, which is used as food in every country in the world, is useful for hypertension, diabetes, cancer, climacteric disorder, neuralgia, cerebrovascular disorder, and the like. Further it is said to bring about normal development of mind and body of young people and that many who take royal jelly live longer. However, there are very few reports elucidating what the physiologically active material in royal jelly is, and the only report is on the action of 10-hydroxydecanoic acid as the largest physiologically active material in royal jelly.

[0007]

Thus, the purpose of the present invention is to provide peptides which inhibit angiotensin-converting enzymes having blood-pressure-raising function and that can exhibit the blood-pressure-lowering action and also to provide oral compositions capable of utilizing the above-mentioned peptides as health food or medical and pharmaceutical products.

[0008]

Means to solve the problem

Namely, the first invention is a peptide having a structure of Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp (hereinafter abbreviated as RJP₈) as its purport. The second invention is a peptide having a structure of Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys (hereinafter abbreviated as RJP₉) as its purport.

[0009]

The third invention is a peptide having a structure of Tyr-Asn-Glu-Val-Pro (hereinafter abbreviated as RJP₅) as its purport. The fourth invention is, as its purport, peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme, which are obtained by decomposing royal jelly using a protein decomposing enzyme. The fifth invention is, as its purport, oral compositions containing peptides described in the inventions of 1-4.

[0010]

Next, detailed explanation on each invention will be given. RJP₈, RJP₉ and RJP₅ in the inventions of 1-4 having structures of Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp, Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys, and Tyr-Asn-Glu-Val-Pro, respectively, are prepared by a method described later, and the structures are decided by structural analysis. These peptides are peptides inhibiting the above-mentioned ACE. Amino acids in the above-mentioned peptides express the following meanings. Namely, Ser represents serine, Leu leucosine, Pro proline, Lys lysine, His histidine, Glu glutamic acid, Trp tryptophan, Ile isoleucine, Tyr tyrosine, Asn asparagin, and Val valine.

[0011]

Next, as ACE-inhibiting peptides from royal jelly in the fourth invention, there are RJP_n (n represents the number of amino acids, for example, polypeptides of n = 4-20) having amino acid sequence (955) showing bellow, and these can be used alone or as a mixture. These ACE-inhibiting peptides are obtained by treatment with protein decomposing enzymes from bacteria (for example, protease such as subtilisin, thermolysin, nagase, and the like) beside protein decomposing enzymes such as trypsin, chymotrypsin, pepsin, bromelain, papain, proline end peptase, and the like. For example, the preparation of RJP₈ is carried out as follows. Royal jell from honey is decomposed under the condition of pH 5.0-9.0 by trypsin, and protein decomposing enzyme and undecomposed royal jelly are precipitated and removed by an acid treatment or heat treatment.

[0012]

Next, the supernatant is neutralized with alkali if necessary, concentrated at a reduced pressure, added into a column packed with a gel filtration support (Toyopearl, Toyo Soda Co.), etc. and eluted with distilled water to collect ACE-inhibiting fractions. Then, if necessary, purification is repeated in a similar manner or purification by ion exchange, hydrophobic column chromatography, and the like is carried out to obtain peptide having ACE-inhibiting property.

[0013]

Further, the ACE-inhibiting fraction can be removed by high speed liquid chromatography using a reverse phase column (gradient elution of acetonitrile/water containing 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) as eluate). Further, it can be prepared by an organic chemical synthesis process. Hereinafter the synthesis of peptide RJP₈ by utilization of solid phase method using polystyrene resin is carried out. As all of amino acids, L-amino acids are used and the functional groups are blocked in advance as follows. Namely, these are Ser (Tos), Lys (2-chlorophenylloxy carbonyl), His (Tos), Glu (O-Bzl), and Trp (Tos). Those in parenthesis represent protective groups. Furthermore, abbreviations for protective groups of amino acids refer to the following substitution groups.

[0014]

Boc: ter-butyloxy-carbonyl group

Tos: p-toluenesulfonyl group

Bzl: benzyl group

PAM: p-methoxy phenyl acetamidomethyl resin

AA_n: n-th amino acid

H-AA₁-PAM is synthesized from (AA₁-PAM) crosslinked to polystyrene resin by deprotection group reaction using TFA, and it is condensed with Boc-AA₂-OH in dichloromethane and dimethyl formamide using DCC (dicyclohexyl carboimide) to synthesize Boc-AA₂-AA₁-PAM. Unreacted AA₁-PAM is inactivated using acetic anhydride.

[0015]

The deprotection group reaction of the Boc-AA₂-AA₁-PAM using TFA is again carried out, and similarly Boc-AA₃-OH is condensed and a condensation reaction up to AA₈ is carried out. Here AA₁ = Ser, AA₂ = Leu, AA₃ = Pro, AA₄ = Lys, AA₅ = Leu, AA₆ = His, AA₇ = Glu, and AA₈ = Trp. After completing the condensation reaction, deprotection group reaction is carried out using hydrogen fluoride (HF) to remove Boc, PAM, and protective groups of side chains so that a desired peptide RJP₈ is obtained.

[0016]

The royal jelly-derived ACE-inhibiting peptides thus obtained are generally separated as a powder form and made with a suitable nontoxic support for oral administration into medical and pharmaceutical products or products for oral intake or digestible nutrients as compositions in a suitable form. As an example of the composition, the ACE-inhibiting peptides are shaped with a pharmaceutically allowable support (excipient, lubricating agent, binding agent, coloring agent, taste controlling agent, perfuming agent) into formulations of medical and pharmaceutical products for oral administration, for example, tablet (sugar-coated tablet, foaming agent, film-coated tablet, chewing tablet, and the like), capsule, troche, powder, fine granule, granule, and the like.

[0017]

Further, they may be made into solid or liquid medical and pharmaceutical products, food, or luxury items, for example, confectioneries, powdered tea, sport drink, alcoholic beverage, ice cream, yogurt, and the like. The content of ACE-inhibiting peptides in the aforementioned oral-intake food is generally in a range of 0.01-100 wt% although it may be varied with the formulation type.

[0018]

The oral products of the present invention show strong ACE-inhibiting activity as shown in test examples to be described below, and can be taken continuously for prevention of hypertension, relaxation of hypertension or regulation of blood pressure, and these are effectively used as health food for prevention of hypertension. When the oral products of the present invention are used for the aforementioned purpose it is suitable to orally take an amount in a range of generally 0.01-50 mg/kg of body weight per day.

[0019]

Furthermore, the above-mentioned active peptides are suitably mixed with bee products, namely, royal jelly, propolis, honey, pollen, larva of bee, and the like so that the effect can be further improved. Namely, the aforementioned bee products may be processed (for example, into various forms such as heat-treated products, or freeze-dried powder). Further, as the oral compositions, the active components are made with a pharmaceutically allowable support into a form (for example, tablet) of medical and pharmaceutical formulations for oral administration or a form of food or luxury items.

[0020]

Operation

All of peptides RJP₈, RJP₉, and RJP₅ of the first to third inventions exhibits ACE-inhibiting activity. In the fourth invention, the peptide obtained from royal jelly as a raw material by decomposition using a protein decomposing enzyme exhibits an inhibiting action of angiotensin-converting enzyme.

[0021]

In the fifth invention, the compositions containing peptides of the first to fourth inventions become oral compositions as health food and inhibit ACE exhibiting a hypertension preventing action.

[0022]

Application example

/4

Hereinafter, concrete application examples of the present invention will be explained. Namely, preparation example and structural analysis of ACE-inhibiting peptides, activity measurement method of ACE-inhibiting peptides and acute toxicity testing results of royal jelly-derived ACE-inhibiting peptides, which are the active components of oral materials of the present invention, are explained.

Measurement of ACE-inhibiting peptides activity

A powder (Sigma Co.) obtained by precipitating 1 g lung of domestic rabbit in acetone and drying was dissolved in 5 mL phosphoric acid buffer (pH 8.3) and centrifuged at 10,000 G for 30 min, and the resulting supernatant was diluted with the aforementioned buffer to 3-fold obtain an ACE enzyme solution, and enzyme inhibition was measured. The measurement was carried out in accordance with the method in Biochem. Pharm., Vol. 20, pp 1637-1648, 1971 and Anal. Biochem., Vol. 84, pp. 361-369, 1978. Namely, 1 mM tripeptide (Hip-His-Leu, Peptide Research Institute)) as a substrate 100 μ L, ACE enzyme solution 100 μ L, and sample solution 100 μ L were added to 100 mM potassium phosphate buffer (containing 300 mM sodium chloride) at pH 8.3, reacted at 37°C for 30 min, heated in boiling water for 5 min to complete the reaction, and hippuric acid of the reaction product was converted using trichlorotriazine reagent to a derivative and the absorbance at a measurement wavelength of 82 nm was measured by colorimetric analysis.

[0023]

The inhibition ratio was calculated by the following equation.

$$\text{Inhibition ratio} = (E_0 - E_i)/E_0 \times 100\%$$

E_0 : Absorbance at 382 nm when the inhibitor is not included.

E_i : Absorbance at 382 nm when the inhibitor is included.

Furthermore, the sample concentration at the inhibition ratio of 50% was denoted as IC_{50} .

ACE inhibiting test

The results of the ACE inhibition activity (IC_{50}) are shown in Table 1.

[0024]

Table 1

①	試 料	IC_{50}
②	製造例1のペプチド	108 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	RJP ₆	2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	RJP ₈	2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	RJP ₉	5.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	CEI ₁₂	110 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	CEI _{β7}	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	CEI ₆	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Key: 1 Sample IC_{50}
2 Peptide of Preparation Example 1

[0025]

In Table 1, CEI₁₂, CEI_{β7}, and CEI₆ are casein-derived peptides (quoted from Food Chemicals, Nov. 39, 1988).

Measurement of protein concentration

The concentration of protein in samples was measured by burette method. The conversion was made by using bovine serum albumin as the standard protein.

Preparation Example 1, preparation example of ACE-inhibiting peptide

Royal jelly protein 2 g were added to 50 mL phosphoric acid buffer (pH 7), then 5 mg trypsin were added, followed by incubating at 37°C for 24 h. Then, it was heated in boiling water for 10 min. After natural cooling, the insoluble was removed by a centrifugal separation process, and the resulting supernatant was added to a column (φ 30 mm x 30 cm) packed with anion-exchange resin (DEAE Toyopearl, Toyo Soda Co.).

[0026]

The unadsorbed fraction was added to a column (ϕ 20 mm x 30 cm) packed with cation-exchange resin column (SP Toyopearl, Toyo Soda Co.), and gradient elution of ammonium formate was conducted on the adsorbed fraction. The elution conditions were: 0-0.5M ammonium formate aqueous solution, pH 6.8, and flow velocity 1.0 mL/min. Furthermore, ACE inhibiting fractions with molecular weight of less than 5000 were collected using an Amicon concentrator and freeze-dried to obtain 283 mg ACE-inhibiting peptide (white powder). It was a composition containing RJP₈, RJP₉, and RJP₅.

Preparation Example 2, preparation example of ACE-inhibiting peptide

Royal jelly protein 2 g were added to 50 mL phosphoric acid buffer (pH 2), then 10 mg pepsin were added, followed by incubating at 37°C for 24 h. Then, it was heated in boiling water for 10 min. After natural cooling, the insoluble was removed by a centrifugal separation process, and the resulting supernatant was added to a column (ϕ 30 mm x 100 cm) packed with Toyopearl 40S and eluted with distilled water.

[0027]

The active fraction was added to a column (ϕ 20 mm x 30 cm) packed with SP Toyopearl, and gradient elution of ammonium formate was conducted on the adsorbed fraction. The elution conditions were: 0-0.5M ammonium formate aqueous solution, pH 6.8, and flow velocity 1.0 mL/min. Furthermore, ACE inhibiting fractions with molecular weight of 500 to less than 5000 were collected using an Amicon concentrator and freeze-dried to obtain 258 mg ACE-inhibiting peptide (white powder). It was a composition containing RJP₈, RJP₈, and RJP₅.

Preparation Example 3, preparation example of RJP₈

Royal jelly protein 2 g were added to 50 mL phosphoric acid buffer (pH 7), then 5 mg trypsin were added, followed by incubating at 37°C for 24 h. After adjusting pH to 1 by hydrochloric acid, the insoluble (p. 957) was removed by centrifugal separation, and the resulting supernatant was concentrated at a reduced pressure. It was concentrated to 5 mL, eluted with distilled water in Sephadex G-25 column chromatography (ϕ 30 mm x 100 cm) to take out active fraction, and concentrated.

[0028]

Furthermore, gradient elution with acetonitrile containing 0.05% TFA as an eluate was carried out by high-speed liquid chromatography (HPLC) using C-8A type column Shimpack PREP-ODS (L) (ϕ 50 mm x 25 cm) to remove the active fraction. The flow velocity was 10 mL/min; the detector was SPD-M6A; detection wavelength was 210 nm. Furthermore, in the separated ACE-inhibiting purified peptide, the yield of freeze-dried RJP₈ (white powder) was 15.3 mg.

Preparation Example 4, preparation example of RJP₉ and RJP₅

The ACE-inhibiting peptide obtained in Preparation Example 1 was further purified by HPLC using reverse phase column to obtain RJP₉ and RJP₅ similar to Preparation Example 3.

Example of amino acid primary structure and amino acid analysis

Next, amino acid structural analysis and amino acid analysis were carried out.

[0029]

It was found by full automatic protein primary structure analyzer PSQ-1 system, Shimazu Seisakusho Co., that the peptides of Preparation Example 3 and Preparation Example 4 were polypeptides shown below. Further, the analytical result supporting amino acid composition of RJP₈, RJP₉, and RJP₅ was determined by amino acid analytical system (PICO-TAG system, Waters Co.).

[0030]

(Primary structure of RJP₈)

Ser-Leu-Pro-Lys-Leu-His-Glu-Trp

(Primary structure of RJP₉)

Ser-Leu-Pro-Ile-Leu-His-Glu-Trp-Lys

(Primary structure of RJP₅)

Tyr-Asn-Glu-Val-Pro

(Amino acid composition of RJP₈)

Glu	14.30%
Ser	14.28%
His	14.32%
Pro	14.25%
Leu	28.72%
Lys	14.16%

Trp - (unable to measure)

(Amino acid composition of RJP₉)

Glu 12.56%

Ser 12.37%

His 12.41%

Pro 12.43%

Leu 25.76%

Lys 12.67%

Ile 12.36%

Trp - (unable to measure)

(Amino acid composition of RJP₅)

Glu 20.60%

Val 21.32%

Pro 19.56%

Asn 19.82%

Tyr 19.96%

Acute toxicity test of each ACE-inhibiting peptide

(1) Testing method

An aqueous solution containing 5% of each ACE-inhibiting peptide was used as sample, and a group of 10 of ICR type mice with average body weight of 21.9 ± 0.4 g was submitted to the experiment. After fasting for one night before testing, the peptide was orally administered at 5 g/kg using sonde, then living and dying and general symptoms were observed for one week.

(2) Test results

For example, LD₅₀ of RJP₅ was 50 g/kg or higher, and there was no fatality. Further, abnormal states such as collapse, piloerection, abnormality in respiration, weight loss (tremor), prostration, sweating and the like were not observed at all in the general observation.

Furthermore, the results in other ACE-inhibiting peptides were also similar.

[0031]

Next, the antihypertensive activity of ACE-inhibiting peptides, RJP₈, RJP₉, and RJP₅ in Preparation Example 1, was tested.

Experimental Example 1, Antihypertensive activity test of each ACE-inhibiting peptide

(1) Sample and administration method

Peptides obtained in Preparation Examples 1, 3, and 4 were dissolved at an amount of 1 g/kg of body weight in saline solution and 5 mL of the resulting sample solution was forced via the oral route.

(2) Experimental animal

Spontaneously hypertensive male rats (SHR) of 8 week old were bred for one week and a group of 5 rats was used for the experiment.

(3) Blood pressure measurement

The blood pressure of each rat was measured with time before and after administration using a non-invasive tail artery tonometer (Riken Co.). Then, the average value was determined.

(4) Test results

The results are shown in Table 2. As is clear from Table 2, the antihypertensive activity was not dependent on the administration amount. Further the antihypertensive activity was continued even after 6 h from the administration.

Experimental Example 2, Antihypertensive activity test of health food of Blending Example 7

The health food (obtained by mixing Propolis liquid with RJP₈) of Blending Example 7, which will be explained later, was forcibly administered at an amount of 3 g/kg of body weight by a probe. As control, health food containing no ACE-inhibiting peptide was used.

[0032]

The same experiment as in Experimental Example 1 was carried out. The results are shown in Table 2. Then, oral compositions shown in Blending Examples 1-7 shown below were prepared by blending peptide of Preparation Example 1 or RJP₈.

Blending Example 1

Defatted powdered milk 8.0 wt%, vegetable oil and fat 11.0 wt%, sugar 14.0 wt%, stabilizer 0.3 wt%, emulsifying agent 0.3 wt%, flavoring 0.1% by weight, peptide (of Preparation Example 1) 1.0 wt%, egg yolk 7.0 wt% and water 55.0 wt% were mixed and stirred to obtain ice cream.

Blending Example 2

A drink was obtained by adding water to purified honey 12,000 mg, vitamin C 1,000 mg, sodium L-glutamate 1 mg, nicotinamide 10 mg, peptide (of Preparation Example 1) 5 mg, and a proper amount of flavoring to make a mixture of 50 mL in total and stirring.

Blending Example 3

Table salt was obtained by adding 5 wt% of peptide of Preparation Example 1 to edible salt.

Blending Example 4

Miso was obtained by kneading miso prepared by the ordinary preparation method with 0.5 wt% of the peptide of Preparation Example 1.

Blending Example 5

Soy sauce was obtained by mixing 100 mL soy sauce prepared by the ordinary preparation method with 0.5 wt% of the peptide of Preparation Example 1.

Blending Example 6

Bread was prepared by adding 0.1 wt% of the peptide of Preparation Example 1 to uncooked bread [dough] prepared by ordinary preparation method.

Blending Example 7

Health food was prepared by adding 1 wt% of RJP₈ to health food prepared by ordinary preparation method, for example, 100 g of propolis food.

[0033]

Table 2

①	ペプチドの 投与量	血圧降下 mmHg ②		
		③ 1Hr 後	④ 3Hr 後	⑤ 6Hr 後
⑥	製造例1のペプチド 1000mg/kg	9.5	16.5	19.5
	R J P. 500mg/kg	7.5	19.8	21.0
	R J P. 250mg/kg	3.8	15.7	17.0
	500mg/kg	8.9	20.8	22.0
	1000mg/kg	15.0	24.0	23.8
	R J P. 1000mg/kg	12.0	19.0	21.8
⑦	実験例2の健康食品 3000mg/kg	—	12.5	13.8
	⑧ 対照	—	5.0	8.0
⑨	カゼイン由来ペプチ ドA 2800mg/kg (注1)	—	32.0	22.0 (注2)

- Key: 1 Administration amount of peptide
 2 Blood pressure drop mmHg
 3 After 1 hour
 4 After 3 h
 5 After 6 h
 6 Peptide of Preparation Example 1, 1000 mg/kg
 7 Health food of Experimental Example 2
 8 Control
 9 Casein-derived peptide A
 2800 mg/kg) (note 1)

[0034]

In Table 2, decrease in the value for blood pressure is the value of blood pressure before administration – blood pressure after administration. Furthermore, the blood pressure before administration in each example is 150-160 mmHg.

(Note 1) It is based on Test Example 1 of Japanese Kokai Patent No. Sho 62[1987]-270533. In this case, the initial blood pressure is 174 mmHg.

(Note 2) It is the value 5 h after the administration.

[0035]

As explained above, to obtain effective hypotensive materials by oral administration of compositions containing peptides obtained by decomposing royal jelly using protein decomposing enzyme proves the physiological activity of royal jelly, which has been stated since

ancient times. Figure 1 is a graph showing the relation between fraction number of peptide obtained in Preparation Example 1 and its absorbance at wavelength 280 nm and also the ACE-inhibiting activity. In the drawing, the solid line 1 shows the relation between the fraction number and absorbance in the crude composition containing peptides RJP₈, RJP₉, and RJP₅ obtained in Preparation Example 1. Further, the broken line 2 shows the ACE-inhibiting activity in the crude composition. As it is seen from the drawing, as the absorbance of the solid line 1 increases, the broken line 2 increases accordingly so that the correlation is confirmed. RJP₈, RJP₉ or RJP₅ exists at each peak, and it is isolated to obtain RJP₈, RJP₉ and RJP₅.

[0036]

Effect of the invention

All of RJP₈, RJP₉ and RJP₅, which are peptides in the first to third inventions, are novel peptides and have such superior effects that all of these are useful as oral compositions such as medical and pharmaceutical products or food with high stability and high effectiveness for prevention and treatment of hypertension, etc.

[0037]

It is shown in the fourth invention that the peptide obtained by decomposing royal jelly using a protein decomposing enzyme is especially effective for prevention and treatment of hypertension. It is shown in the fifth invention that peptides of the first to fourth inventions can be taken by oral administration and the compositions containing the aforementioned peptides become oral compositions suitable as health food for prevention of hypertension.

Brief description of the figures

Figure 1 shows an application example of the present invention, and it is a graph showing the relation between the fraction number of peptide and the absorbance and the angiotensin-converting enzyme inhibition activity.

/7

Sequence table

Sequence number: 1
 Length of sequence: 8
 Type of sequence: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence:
 Ser Leu Pro Lys Leu His Glu Trp

1 5
 Sequence number: 2
 Length of sequence: 9
 Type of sequence: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence:
 Ser Leu Pro Ile Leu His Glu Trp Lys

1 5
 Sequence number: 3
 Length of sequence: 5
 Type of sequence: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence:

Tyr Asn Glu Val Pro

1 5

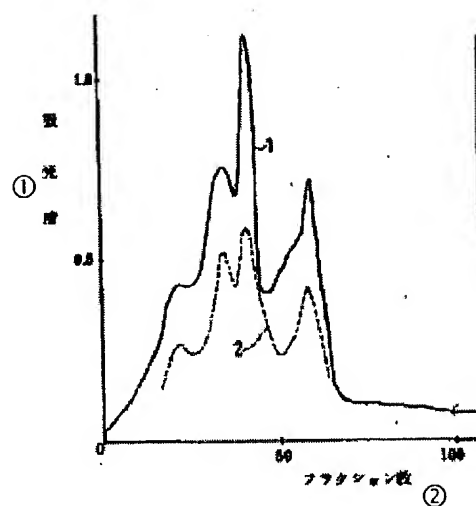


Figure 1

Key: 1 Ordinate: Absorbance
 2 Abscissa: Fraction number

